ÉTUDE DE LA FLORE FONGIQUE DU CHÊNE (*QUERCUS* sp.) CARACTÉRISTIQUE DU SÉCHAGE NATUREL DES BOIS DESTINÉS A LA TONNELLERIE

N. VIVAS[1] & Y. GLORIES[2]

(1) tonnellerie DEMPTOS détaché à l'institut d'onologie, Université de Bordeaux II
(2) Laboratoire de chimie appliqué, Institut d'oenologie, Université de Bordeaux II, 351, cours de la libération, 33405 Talence.

RÉSUMÉ - Après purification par repiquage successifs de chaque colonie morphologiquement différente, l'identification n'a concerné que les champignons rencontrés dans tous les échantillons et donc caractéristique du séchage naturel du bois de chêne. Cinq espèces sont retenues: il s'agit de *Aureobasidium pullulans*, de *Trichoderma harzianum*, de *Trichoderma koningii*, de *Rhyzopus stolonifer* et d'une espèce non identifiée codée ECLR2-91. *A. pullulans* représente plus de 80% de la population, *Trichoderma* sp. 10 à 20% et les autres moins de 10%.

Les champignons isolés des merrains ont un cycle végétatif complet, ce qui suggère qu'ils trouvent sur le bois l'ensemble des conditions favorables à leur developpement. Les champignons répartis à la surface, mais aussi dans les premiers millimètres du bois, libèrent dans le milieu des enzymes. Pour l'essentiel se sont des heterosidases.

ABSTRACT - After purification by sub-culturing of each morphologically different colony, only the mushroms present in all samples were identified as being characteristic to natural air-drying of oak-wood. Five species were kept: *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Rhyzopus stolonifer* and an unidentified species, coded as ECLR2-91. More than 80% of the total population was *A. pullulans*, *Trichoderma* sp. at 10 to 20% and the other species at less than 10%.

Mushrooms isolated on "merrains" have a complete vegetative cycle, wich suggest that they find all the favorable conditions on wood for their growth. Mushrooms distributed over the surface, as well as in the first millimeters of wood, discharge enzymes into environnement. Primarily, these are heterosidases.

INTRODUCTION

Le séchage du bois de chêne se pratique depuis fort longtemps. Cette technique s'impose pour assurer la résistance mécanique du fût grâce à l'équilibre du taux d'hygrométrie (Hr) relatif du bois avec le milieu ambiant. Dans le climat océanique 15% paraît un niveau satisfaisant; Pontallier et al. (1982) donne une fourchette de 14 à 18%. Dans ce contexte restreint, le séchage peut être accéléré par passage des merrains à l'étuve pour abaisser en quelques jours l'humidité du bois (Giordano, 1987).

Mais le bois séché artificiellement ne semble pas convenir à l'élevage des vins et à leur amélioration gustative (Taransaud, 1976).

Le bois exposé à l'air libre subit, en plus d'une déshydratation progressive, un lessivage intense, entraînant une fraction polyphénolique et minérale hydrosolubles. La diminution de la teneur en polyphénols contribue à abaisser les sensations d'amertume et d'astringence (Marche & Joseph, 1972). Là encore, des essais de lessivage du bois suivit d'un séchage à l'étuve ne reflète pas exactement l'effet d'une exposition de plusieurs mois à l'extérieur. Si en proportion l'abaissement de la concentration en polyphénols rend les impressions amers et astringentes moins agressives, en revanche, ramenée en masse la fraction polyphénolique résiduelle demeure autant agressive. Enfin, au cours d'un élevage en fût neuf de 12 à 18 mois les écarts en phénols totaux imputables aux ellagitanins restent très limités en fonction du mode de séchage (Pontallier, 1981) et demeurent insuffisants pour expliquer les différences révélées lors de la dégustation.

En plus du lessivage et de la perte d'eau, l'exposition du bois au soleil et aux amplitudes thermiques journaliéres (Δthj = 10°C) et saisonnières (Δths = 15°C) en climat océanique provoque des oxydations chimiques, conduisant à la dégradation de certains composés phénoliques (Higuchi & al., 1967) et à l'insolubilisation d'autres (Peng & al., 1991; Vivas & Glories, 1992); l'accumulation de spores à la surface du bois peut également intervenir, pour une part, dans la modification des caractéristiques du bois. Marche & Joseph (1972) puis Joseph & al. (1975) ont été les premiers à interpréter certaines modifications structurales, en particulier l'hydrolyse des hétérosides coumariques, par l'action d'enzymes exocellulaires d'origine microbienne. Greaves (1970) a mis en évidence la possibilité de développement de bactéries sur du bois d'Eucalyptus et de Pinus, plus récemment Chen & Chang (1985) ont étudié la biodégradation de la lignine. Monties (1992) envisage également une participation active de la flore microbienne dans le processus de transformation de la lignine et des ellagitanins.

Ainsi, devant le manque d'informations sur les mécanismes biologiques attachés au séchage naturel nous avons entrepris une première étude sur la flore fongique du bois de chêne dans la région bordelaise et en situation de séchage naturel.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1- Isolement des microorganismes

Les moisissures sont isolées:

a) à partir de sciure (60 mesh) représentant les 5 premiers millimétres du bois de surface (la sciure est conservée à -20°C) d'un ensemble de douelles séchées naturellement de 6 à 18 mois et réparties sur tous le parc à bois. Les populations fongiques sont obtenues par sonication (2 x 5s) de 1g de sciure de surface des douelles dans 10 ml d'eau stérile.

b) à partir de frottis de la surface des bois en cours de séchage. Un coton hydrophyle stérile balayant la surface des merrains est agité dans 10 ml d'eau stérile.

Les milieux solides sont ensemencés par 1ml des eaux de macération de la sciure. L'incubation est de 24 ou 72H à 25°C. Les souches morphologiquement différentes sont isolées par fragmentation de portion de mycelium. Au delà de 5j de culture la boite est entiérement recouverte par les moisissures et la sélection de souches pures devient impossible. Seuls les champignons rencontrés dans tout les iso-

lements sont conservés pour être multipliés, cultivés et identifiés; car un bon nombre de colonies de champignon n'est présent que sur certains échantillons. Le but du travail étant de définir la flore spécifique du séchage naturel, nous ne conservons que quelques spécimens retrouvés de façon constante.

Les repiquages successifs, nécessaires pour purifier chaque souche repérée, sont réalisés sur milieu solide MAG.

2- Culture et constitution de collection

* milieu de culture:

- Milieu CZAPEK-DOX:

$(NH_4)H_2PO_4$	5,75 g/l
K_2HPO_4	1,0 g/l
KCl	0,5 g/l
$MgSO_4$	0,5 g/l
$FeSO_4$	0,005 g/l
Glucose	25 g/l
Eau distillée	qsp 1 l

pH= 5; stérilisé 15min 120°C

- Milieu non proliférant (NP):

$(NH_4)H_2PO_4$	5,75 g/l
$K_2 HPO_4$	1,0 g/l
KCl	0,5 g/l
$MgSO_4$	0,5 g/l
$FeSO_4$	0,005 g/l
eau distillée	qsp 1 l

pH= 5; stérilisé 15min 120°C

-milieu MAG:

Extrait de malte gélosé	45 g/l
Agar	15 g/l
Glucose	25 g/l
Eau distillée	qsp 1l

stérilisé 15 mn à 115°C.

- Milieu bois:

Extrait de chêne à l'eau	1 g/l
Extrait de malt gélosé	30 g/l
Agar	20 g/l
Eau distillée	qsp 1 l

pH=5; filtration stérile 0,22µm.

* collection:

Les moisissures en culture sont conservées soit sur milieu bois sur gélose inclinée, soit en boite de Pétri après sporulation sur milieu MAG, soit en milieu liquide NP supplémenté par 20% de glycérol et conservé à -20°C.

3- Identification des souches

L'identification s'effectue en collaboration avec A. Labarere (INRA-Université de Bordeaux II) et E.Gueho (institut Pasteur, Paris).

Les tests API™ sont pratiqués sur milieu liquide. La culture liquide (CZAPEK-DOX) est ensemencée à partir de culture sur milieux solides MAG. Après 15j de culture à 20°C(± 2°C), sur table d'agitation, la culture de mycélium est homogénéisée à l'ultraturax (30s), 10 ml sont prélevés et centrifugés (20 mn, 4500 tpm), rincés à l'eau stérile et recentrifugés. Le culot est mis en suspension dans un milieu non prolifèrant. Aprés 48H à 30°c le mélange ou le surnageant clair sont utilisés pour les tests d'assimilation et de fermentation.

4- Dosage des macromolécules fongiques

Précipitation et dosage des polysaccharides

a) précipitation

Les polysaccharides sont précipités (24H à 4°c) à partir de 0,5 ml de milieu de culture centrifugé (4500tpm, 20mn) pour 2,5 ml d'éthanol 95% v/v (1/5; v/v). Aprés lavage par de l'éthanol 95% à -20°c et centrifugation (4500tpm , 20mn), le précipité est dissout dans 10ml d'eau

b) dosage des polysaccharides neutres:

Les polysaccharides neutres sont dosés par la methode au phénol sulfurique.

A 1 ml de solution à doser ont ajoute 1 ml de phénol (solution aqueuse à 5%), 5 ml d'acide sulfurique RP. Aprés agitation immédiate, les tubes sont déposés au bain-marie à 100°C pendant 5mn, refroidis à 0°C. La densité optique est lue à 490nm sous 1 cm.

Les valeurs sont issues d'une moyenne de trois dosages, les résultats sont exprimés en mg/l d'équivalent glucose.

c) dosage des polysaccharides acides:

Les polysaccharides acides sont dosés par la méthode au métaphénylphénol.

A 1ml de solution a doser on ajoute 5ml d'acide sulfurique RP, en opérant dans un bain d'eau glacée. Après agitation, les tubes sont placés dans un bain-marie à 100°C pendant 3mn, refroidis à 0°C et supplémentés par 100µl de métaphénylphénol (0,15% dans NaOH à 0,5%). Après 15mn la densité optique est mesurée à 520nm sous 1 cm.

Les valeurs sont issus d'une moyenne de trois dosages, les résultats sont exprimés en mg/l d'équivalent ac. galacturonique.

Dosage des protéines totale

Les protéines sont dosées par la méthode au bleu de Coomassie.

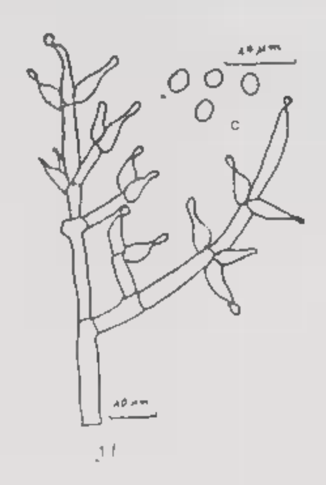
A 100 µml de milieu de culture centrifugé (4500 tpm, 20mn) on ajoute 1 ml de bleu de Coomassie G250 [10mg bl. Coom. G250 + 5ml d'EtOH 95% (v/v) + 10ml d'acide phosphorique à 85% (p/v) + eau distillée (qsp 100 ml)]. Après 5 mn la densité optique est mesurée à 595 nm sous 1cm.

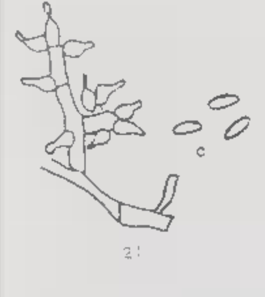
Les résultats sont exprimés en mg/l d'équivalent BSA (bovine serum albumen).

RÉSULTATS

I - Isolement et identification des souches. Localisation sur le parc à bois

Les repiquages successifs ont permis d'isoler 5 champignons dont 3 représentent 99% de la biomasse et 1 plus de 80%. Pour ce dernier nous possédons 4 souches isolées à différents moments du séchage et à différents endroits sur le parc à bois.





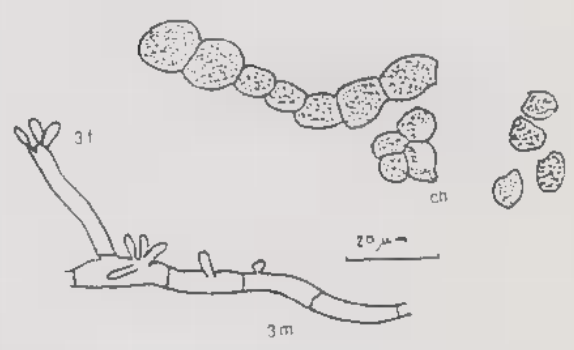


Planche 1 - Structure morphologique de *Trichoderma harizanum* (1: f= fructification; c= conidie), de *Trichoderma koningii* (2) et d'*Aureobasidium pullulans* (3: m= mycélium; f= fructification; ch= chlamydospores).

Tableau I: Identification des souches de champignons isolés du bois de chêne. Tests morphologiques.

Table I: Identification of strains of fungi isolated on oak wood. Morphological tests.

organes decrit	Genres et espèces			
colonies	SB-92	PNDS4-91	VFFS1-91	VCFS1-91
couleur:	blanc-gris	noir	vert-olive	vert foncé
forme:	non caract.	ronde	irrégulières	ronde
aspect:	filamenteux	glacé	poudreux	poudreux
croisance des thalles	très rapide	moyenne	rapide	rapide
stolons.	+	-		-
appareil reproducteur				
sporocytospores:	+	-		-
haut (mm)	2.5			
spores:	+		-	-
forme	anguleuses			
diam (um)	350			
long (um)	10-15			
chlamydospores:	-	+	+	+
conidies	-	+	+	+
forme		lisses elliptiques	subglobulaires	ellip. ou oblongues
diam(um)		7-16	2,8-3,2	3,5
long(um)		3,5-7	2,5-2,8	2-2,8
classification				
division	Amastigomicota	Amastigomicota	Amastigomicota	Amastigomicota
groupes	Zygomycètes	Deuteromycètes	Deuteromycètes	Deuteromycètes
ordres	Mucorales	Hypomycètes	Hypomycètes	Hypomycètes
identification				
genres	Rhizopus	Aureobasidium	Trichoderma	Trichoderma
espèces	stolonifer	pullulans	harzianum	koningii

Tableau II: Identification de *Aureobasidium pullulans* et de *Trichoderma harzianum* par des tests physiologiques d'assimilation et de fermentation.

Table II: Identification of *Aureobasidium pullulans* and *Trichoderma harzianum* by tests of assimilation and fermentation.

TESTS PHYSIOLOGIQUES	FERMENTATION		ASSIMILATION	
SUBSTRATS CARBONES	Aureobasidium pullulans	Trichoderma harzianum	Aureobasidium pullulans	Trichoderma harzianum
glycérol	-	-	-	+
érythritol	-	-	+	+
D-arabinose	-	-	-	+
L-arabinose	-	+	-	+
ribose	-	+	-	+
D-xylose	-	+	-	+
L-xylose	+	-	+	-
adonitol	+	-	+	-
β méthyl-xyloside	-	-	-	-
galactose	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+
L-sorbose	+	-	+	+
rhamnose	+	+	+	-
dulcitol	+	-	+	+
inositol	-	-	-	-
mannitol		+	+	+
sorbitol	+	-	+	-
α méthyl-D-mannoside	-	+	-	-
α méthyl-D-glucoside	+	-	+	-
N-acéthyl glucosaminidase	-	+	+	+
amygdaline	-	+	+	+
arbutine	+	+	+	+
esculine	+	+	+	+
salicine	-	+	+	+
cellobiose	-	+	-	+
maltose	-	-	+	+
lactose	+	+	+	-
mélibiose	-	+	+	-
saccharose	-	+	+	-
tréhalose	-	+	+	+
inuline	-	+	+	-
mélézitose	-	-	+	-
D-raffinose	-	-	+	-
amidon	-	+	+	+
glycogène	-	+	+	+
xylitol	-	-	-	-
β gentiobiose	-	+	+	-
D-turanose	-	+	+	+
D lyxose	+	+	+	+
D tagatose	-		+	-
D fucose	-	-	-	+
D-arabitol	-		-	-
L-arabitol	-	+	+	[illegible]
gluconate	-	+	-	+
2-céto-gluconate	+	+	[illegible]	+
5-céto-gluconate	+	-	+	-

Les résultats d'identification sont rassemblés dans les tableaux I et II et la planche 1. Nous avons identifié:

- *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud;
- *Trichoderma harzianum* Rifai
- *Trichoderma koningii* Oud.
- *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. ex Fr) Lindner

et isolé une souche non déterminée codée "ECLR2-91".

Les sources d'inoculation sont diverses (tableau III) puisqu'à l'exception de ECLR l'ensemble des espèces se rencontre avec plus ou moins d'importance dans tout l'environnement. Ainsi, au cours du séchage, les spores et les conidies se déposeront à la surface du bois et seules les mieux adaptées pourront s'implanter et devenir majoritaires. Le champignon ECLR peut être considéré comme une contamination car il provient exclusivement de l'écorce des arbres. *R. stolonifer* est égalment une souche dont la présence est accidentelle dans la mesure où elle a été isolée d'un grand nombre de substrat moisi (Botton & al., 1985) et n'est pas spécifique de la flore fongique liée au séchage naturel.

Tableau III: Localisation des différentes sources de contamination sur le parc à bois. Isolement à partir: d'eaux de ruissellement (a), d'écouvillonnage de la surface du bois (b), de macération de terre fine (c) de stabulation de gélose à l'aire (d)

Table III: Localisation of the differents contamination sources on the oak-wood stock. Isolements: water (a), wood area (b), soil (c), atmospher (d).

	eaux	écorce des billes de bois	sol	atmosphère
isolement	a	b	c	d
genres/espèces				
R. stolonifer.	-	+	+++	-
A. pullulans	++	+	-	-
T. harzianum	+++	-	+	+
T. koningii	++	-	+	+
"ECLR2-92"	0	+++	0	0

0: absent; -: rare (< 1souche/ 10); +: présent (1 / 10); ++: fréquent (2 à 8/10); +++: espèce dominante (>8/10)

II - Ecologie des moisissures au cours du séchage naturel

1- Succession des moisissures au cours du séchage

Sur tout le parc à bois on prélève des merrains à différents stades de séchage; des éprouvettes de bois (5x5 cm) sont découpées et réparties en poches stériles avant analyse. Chaque échantillon (10 éprouvettes) représente un temps de séchage différent (0, 4, 6, 12, 18, 20 mois). Au laboratoire les éprouvettes sont lavées par 100 ml d'eau stérile durant 2 h sur table d'agitation; puis soniquées (5x2s). Les eaux de lavage sont utilisées pour le comptage des spores sur MAG; les éprouvettes rincées sont déposées en boîtes de Pétri et recouvertes de gélose MAG refroidie (40°C), elles serviront à l'étude de la répartition des mycéliums sur le bois.

Après 4j d'incubation (25°C) pour les spores et 6j pour le mycélium on compte:

- le nombres de colonies visibles (SFT = spores formant des thalles). Ce critère est à employer avec précaution. Il peut donner une indication sur la pression de l'inoculum à la surface du bois et exprime également la capacité à sporuler ou l'aptitude du mycélium à se fragmenter. Chaque SFT peut englober une ou plusieurs spores.

- le % de mycélium de surface (% mycélium). Cette méthode permet de mieux exprimer l'importance de la biomasse fongique à la surface du bois.

Tout au long du séchage naturel, le nombre de spores augmente (fig. 1a); au delà de 12 mois le rythme d'accumulation de l'inoculum (spores, conidies, chlamydospores) s'infléchit sensiblement. Dans le même temps (fig.1b) la colonisation du bois par les moisissures est rapide et maximale en 12 mois.

a) évolution de la quantité d'inoculum et de la vitesse d'implantation des mycéliums (fig. 1a et b)

Les conidies, les spores et les chlamydospores ne participent pas au processus de séchage, en revanche elles seront déposées par le vent ou par les eaux de lessivage sur les merrains verts. Les mycéliums implantés sur le bois (*Trichoderma* sp.) ou dans les fibres de surface (*A. pullulans*) sont issus de cet inoculum indigène qui germe et forme un thalle. Plus la pression d'inoculation est grande et plus vite le bois est recouvert de champignons.

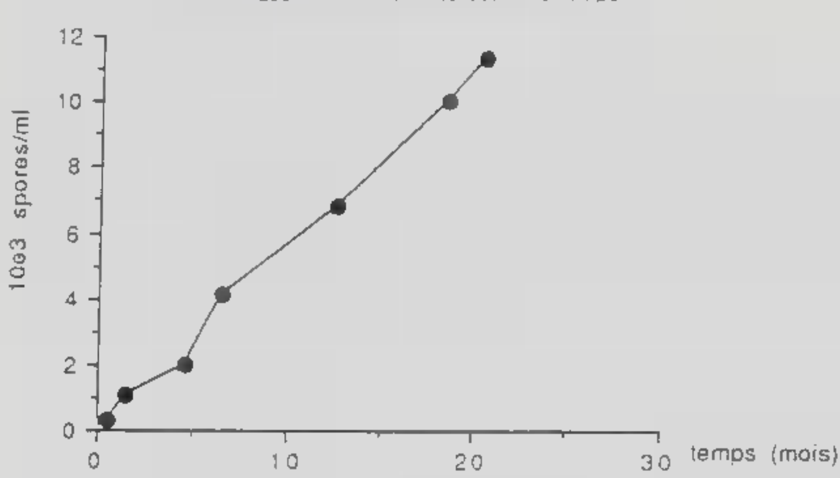
L'augmentation du nombre de spores dans les premiers mois est essentiellement liée à un apport du milieu environnant (vent, eau, poussière...), mais dès que les premiers thalles ont atteint leur maturité phénologique, le recouvrement du bois se réalise de proche en proche. Lorsque la colonisation devient saturante (12 mois: 87%), l'inoculum sporogène reste constant. Toute la surface est occupée par des thalles se chevauchant plus ou moins et l'expansion des populations en place est nulle. Les spores assureront la dispersion des souches sur du bois vert.

b) répartition des espèces en fonction de la durée du séchage (fig. 2)

D'après la classification de Jarwis (1978) *A. pullulans* est une espèce constante (fréquence > 80%), *Trichoderma* sp. est occasionelle (fréquence 10-20%) et les autres espèces représentant moins de 10% de la population sont accidentelles (*R. stolonifer*, ECLR).

La dynamique des populations demeure relativement stable. On peut noter , en début de séchage la présence de 3 à 4 spores d'espèces différentes, mais dès le 6ème mois seul *A. pullulans* est présent. En fin de séchage la part des *Trichoderma* sp. s'accroît. Les observations sont renouvelées pour les mycéliums implantés, avec toutefois une présence exclusive plus rapide et plus massive d' *A. pullulans*. Ceci suggère qu'il s'agit d'une espèce bien adaptée au développement sur bois et qui posséde une source d'inoculation dans l'environnement.

L'étude de l'écologie des espèces, implantées sur le bois, révèle qu' *A. pullulans* est une moisissure spécifique du séchage naturel du bois de chêne; au moins dans le Bordelais. Les autres champignons peuvent être considérés comme des espèces de contamination.



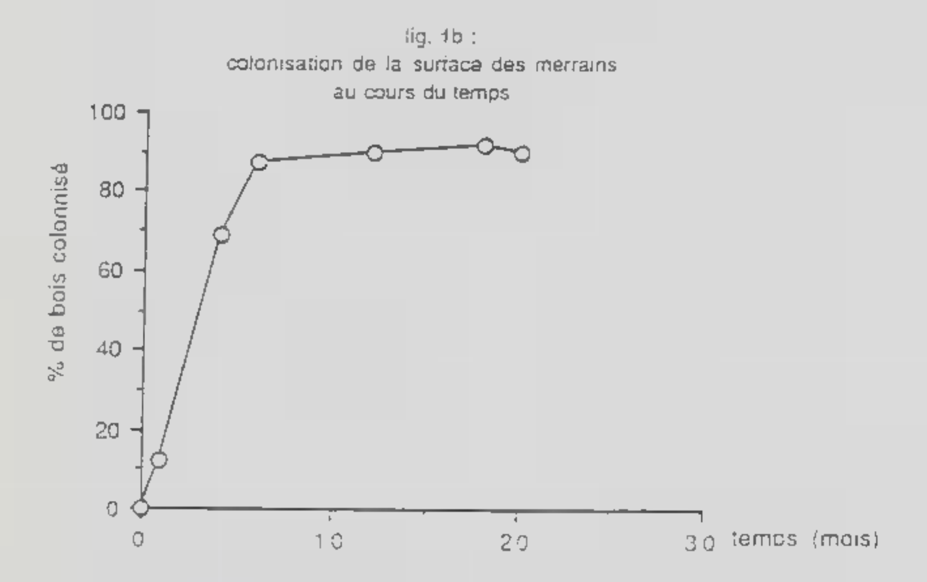
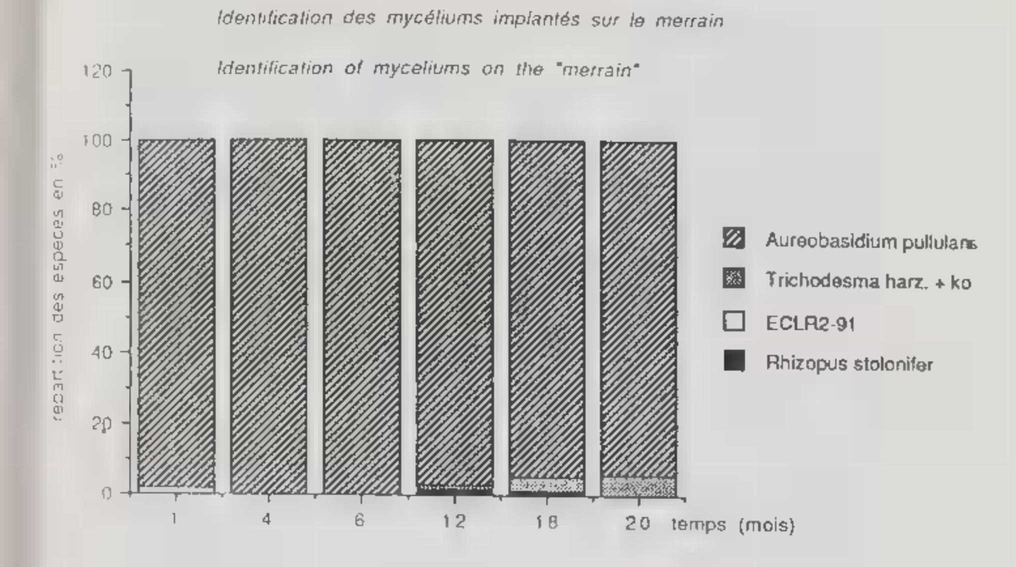


Figure 1 - Evolution du nombre de spores et de la surface des merrains colonisés par les champignons au cours du séchage naturel.

Figure 1 - Evolution of spores number and the area who colonisated by the fungus during air-drying.



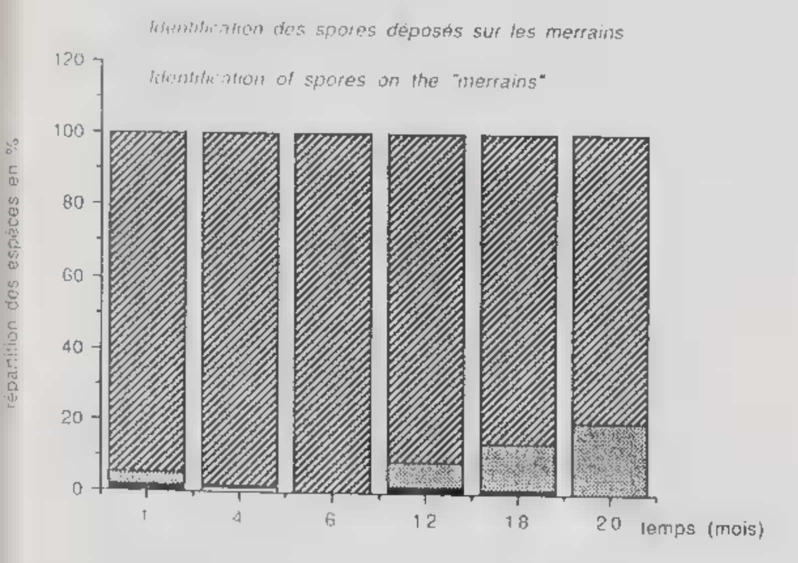


Figure 2 - Répartition de champignons au cours du séchage naturel.

Figure 2 - Repartition of fungus species during air-drying.

2- Les phénomènes d'inhibition

La relative homogénéité de la flore fongique et l'implantation tardive de *Trichoderma sp.*, sur le bois déja colonisé par *A. pullulans* en phase stationnaire, laissent supposer qu'un certain nombre de mécanismes d'inhibition puissent agir.

Nous évaluons l'effet inhibiteur éventuel des *Trichoderma sp.* et de *A. pullulans* sur plusieurs microorganismes fréquemment rencontrés dans l'environnement. Les souches testées sont prélevées sur des milieux solides et déposées par stries successives au centre de la boite (milieu solide MAG). Après 96H d'incubation à 25°C on ajoute au milieu 1ml d'une suspension de spore (*Trichoderma sp.*) ou de chlamydospores (*A. pullulans*); aprés 8j d'incubation les résultats sont collectés:

- l'inhibition est positive (+) lorsque la souche préalablement implantée est recouverte par l'espèce testée et la boîte est pratiquement occupée par un seul type de microorganisme;

- l'inhibition est négative (-) lorsque l'espèce testée ne s'est pas développée;

- l'inhibition est faible (+/-) lorsque les deux mycéliums ont continué leur développement chaqu'un dans une partie libre du milieu de culture.

Tableau IV: Inhibition de plusieurs champignons par *Trichoderma* sp. et *Aureobasidium pullulans*. +: inhibition +/-: faible inhibition -: sans effet

Table IV: Inhibition of several fugus by *Trichoderma sp.* and *Aureobasidium pullulans*.

Espèces testées	Espèces inhibitrices	
	Trichoderma sp.	A. pullulans
Saccharomyces cerevisiae (EG8C)	+	+
Trichoderma sp.	/	+/-
A. pullulans	+	/
Botrytis cinerea	+	+
A. niger	+	+/-
Penicillium sp.	+	+/-
R. stolonifer	+/-	-
ECLR2-91	+	+/-

On constate (tableau IV) que les deux espèces (*Trichoderma sp*; *A. pullulans* inhibent tous les microorganismes testés. On comprend donc que lorsque *Aureobasidium*, après 18 à 24 mois de développement, laisse un vide écologique sur le bois, *T. harzianum* et *koningii* puissent s'implanter.

De part leur adaptation aux milieux ligneux et leur virulence, ces champignons ont la possibilités de coloniser la surface du bois et constituent une flore fongique limitée et spécifique. L'antagonisme de *Trichoderma* sp. à l'égard de *botrytis cinerea* a déja été signalé par Wood (1951). Artigues (1981) met en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le niveau de l'activité β (1-3) glucanase de *Trichoderma* sp. et la destruction du champignon.

III - croissance des moisissures

Afin de mesurer l'aptitude des champignons à se développer, nous testons plusieurs espèces, isolées du bois, en milieu liquide (1mg de mycélium sec/ 100ml de milieu). Après 1 ou 2 mois sur table d'agitation à 20°C (± 2°C) les cultures sont centrifugées (4500 tpm, 30mn). Le culot est rincé 3 fois par de l'eau stérile et 3 fois par de l'éthanol 95% v/v; chaque opération est suivie d'une centrifugation (4000 tpm, 20mn). Les mycéliums sont alors déshydratés à l'étuve (60°C), jusqu'à poids constant. Par différence de pesée entre le tube taré vide et contenant le culot de centrifugation sec on évalue la quantité de mycélium produit en mg/100ml de milieu ou en mg/g de substrat carboné.

Tableau V: Croissance de plusieurs champignons du bois de chêne en milieu liquide [culture 2 mois; substrat carboné: glucose 25g/l; inoculum: 1mg/100ml].

Table V: Growth of several fugus in liquid medium.

espèces	souches	poid de mycellium mg/100ml de milieu	poid de mycellium mg/g de substrat	sucre résiduel g/l	mg mycellium par g de substrat consommé
Trichoderma:					
- T. harzianum	VFFS2-91	100	40	0.5	41
- T. koningii	VCFS1-91	7,5	3	9.0	4,7
Aureobasidium:					
- A. pullulans	PNDS4-91	127,5	51	1,2	53,5
- A. pullulans	SNDS1-91	7,1	3,1	9,5	4,5
Rhizopus:					
-R. stolonifer	SB-92	6,2	2,5	8,4	3,7
inconnus:					
-	ECLR2-91	2	0,8	12	1,5

La croissance des microorganismes en milieu glucosé est trés différente en fonction des espèces étudiées (tableau V):

- ECLR2-91 se développe peu; d'ailleurs sur le bois ou sur des extraits de bois gélosé sa croissance est également trés lente;

- *R. stolonifer* (SB-92) a une croissance trés limitée alors qu'en milieu solide, sur du bois ou sur des extraits de bois gélosé sa croissance est très rapide; il semble donc que le milieu liquide ne convienne pas pour sa culture;

- *T. koningii* (VCFS1-91) et *A. pullulans* (SNDS1-91) présentent une faible capacité à se développer sur un milieu liquide; les milieux gélosés donnent le même type de résultats;

- *T. harzianum* (VFFS2-91) et *A. pullulans* (PNDS4-91) sont les mieux adaptés au milieu liquide, leur croissance est rapide; l'utilisation du sucre est compléte. En outre ces caractéristiques s'expriment également sur le bois et dans des milieux gélosés d'extrait de bois.

Le métabolisme glucidique (avec du glucose directement assimilable) est déficient pour la plupart des espèces testées, mis à part *T. koningii* (VCFS1-91) et *A. pullulans* (SNDS1-91).

Tableau VI: Incidence du substrat carboné sur la croissance de *Trichoderma harzianum* et *Aureobasidium pullulans* [culture: 1mois; inoculum: 1mg/100ml]

Table VI: Incidence of the substrat on growth of *Trichoderma harzianum* and *Aureobasidium pullulans*

		mg de mycélium/100ml		mg de mycélium/g de substrat	
substrat	dose g/l	T. harz.	A. pull.	T.harz	A. pull.
glucose	25	24	34	9,6	16,3
polysaccharides de bois	25	10	8	4	3,2
tanins de chêne à l'eau	25	33	46	13,2	18,4
cellulose	5	14	9	28	18

Afin de tester l'influence de la source énergétique sur la croissance de *T. harzianum* et de *A. pullulans*, nous avons réalisé des cultures dans les mêmes conditions en utilisant une gamme de substrats que l'on peut retrouver dans le bois de chêne:

- glucose: D(+)-glucose;

- polysaccharides: extraits à partir de sciure de chêne (60 mesh) dans HCl à 0,1% (1kg de sciure pour 5 l, agité durant 72H à température ambiante). Le liquide de couleur bleutée est ensuite additionné d'EtOH 95% à raison de 1vol pour 9 vol d'EtOH. Après 3 jours à -4°C le précipité formé est centrifugé (5000 tpm, 30mn), rincé par 3 fois avec de l'EtOH 95% à -15°C et centrifugé (5000tpm, 30mn). Le culot est repris par le minimum d'eau et lyophilisé. La poudre obtenue renferme 20% de polysaccharides neutres. La plus grande part des polysaccharides du bois étant sous forme combinée, nous avons dû abandonner leur purification sur pvpp car elle s'avère peu rentable;

- cellulose: cellulose DIFCO™;

- tanins de chêne: extraits par épuisement à l'eau de 1kg de sciure (1/5, p/v) durant 96H à température ambiante, sur table d'agitation. Les solutions brutes sont collectées, le volume réduit au 1/2 par évaporation et l'extrait aqueux concentré est alors purifié par demixion selon la technique de Glories (1978).

Les deux espèces étudiées (tableau VI) peuvent se développer sur tous les substrats employés, on peut supposer qu'elles possèdent des activités enzymatiques spécifiques au métabolisme des différentes sources d'osides (hétérosides, holosides). Le rendement d'utilisation de ces composés peut être présenté par ordre décroissant du poids de mycélium produit par g de substrat:

- *A. pullulans:* tanins ≥ cellulose> glucose>> polysaccharides

- *T. harzianum:* cellulose>> tanin> glucose> polysaccharides

Ce classement souligne une plus grande affinité à l'égard de la cellulose pour *T. harzianum* (champignon cellulolytique) et une affinité cellulose/tanins de chêne pour *A. pullulans* (champignon saprophyte, lignicole). La culture de ces champignons sur milieu de Eggins & Pugh (in Botton & al., 1985) confirme le classement établi, ainsi que le caractère cellulolytique des *Trichoderma sp.* en général (Botton et al., 1988). Ce milieu est constitué de $(NH_4)_2SO_4$: 0,5g; L-asparagine: 0,5g; KH_2 PO_4: 1,0g; KCl: 0,5g; MgSO 4: 0,2g; $CaCl_2$: 0,1g; DIFCO Yeast Extract: 0,5g; Agar: 20g; cellulose: 10g; eau qsp 1000ml.

Ces champignons ne semblent pas adaptés à l'hydrolyse et à l'assimilation des polysaccharides du bois, en revanche la croissance est améliorée si on utilise des polysaccharides levuriens ou même du glucane de *Botrytis cinerea*. Ceci est à relier à l'existence de glucanase adaptée à la libération des oses constitutifs (Dubourdieu, 1982; Llauberes, 1988) de ces macromolécules glucidiques.

IV - Libération de macromolécules

1- autolyse de *Trichoderma harzianum* et de *Aureobasidium pullulans*

Après une phase stationnaire plus ou moins longue, les champignons entrent en phase de déclin. Une autolyse endocellulaire progressive débute alors sous l'action de différentes activités enzymatiques étudiées chez *Saccharomyces* sp. (protéase: Silva & al.,1987; Feuillat, 1985; estérase: Chen & al., 1980; glucanase: Llauberes, 1987); chez *Pediococcus* (Llauberes, 1987) et chez *Botrytis cinerea* (Dubourdieu, 1982).

L'étude porte sur la turbidité des cultures au cours du développement des moisissures (Turbidimètre SIGRIST PHOTOMETER KTL65) en milieu liquide CZAPEK-DOX (1mg de mycélium sec/100ml) sur table d'agitation; ainsi que sur les phénomènes de lyse dans le même milieu suivis par mesure de la DO 210nm selon le protocole de Garbay & Lonvaud (1991).

Tableau VII: Evolution de la turbidité des milieux de cultures au cours du développement de *Trichoderma harzianum*, *Aureobasidium pullulans* et ECLR2 [culture: milieu liquide sur table d'agitation, inoculum: 1mg/100ml] unité: NTU

Table VII: Evolution of the culture's turbidity during the developpement of *Trichoderma harzianum* and *Aureobasidium pullulans*.

espèces	Trichoderma harzianum	Aureobasidium pullulans		Inconnue
souches	VFFS2-91	SNDS1-91	PNDS4-91	ECLR2-91
temps en semaines:				
1	10	22	8	2
2	10	36	10	6
4	11	42	26	9
6	28	72	28	15
8	32	110	89	18
10	36	112	92	21

La turbidité du milieu augmente très rapidement pour *A. pullulans*; en revanche, *T. harzianum* et ECLR2 opacifient peu le milieu. La turbidité est proportionnelle [illegible] poids de mycélium produit et au-delà de 10 semaines toutes les cultures perdent un

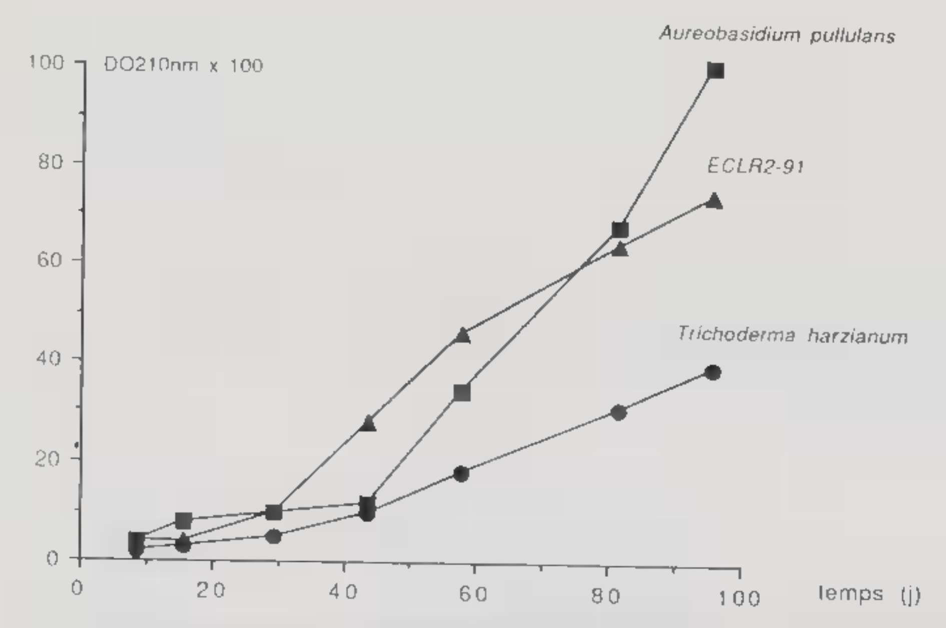


Figure 3 - Autolyse des souches de moisissures isolées du bois de chêne en fonction du temps de culture [l'autolyse est suivit par la mesure de la DO210nm]

Figure 3 - Influence of culture's time on the autolys of oak-wood fugus.

peu de trouble. Cette observation indique la fin de la croissance des champignons et le début de leur autolyse (Garbay & Lonvaud, 1991).

La mesure de la DO 210nm montre (fig.3) que l'autolyse débute dés les premiers jours de culture. Le relarguage de macromolécules absorbant dans l'UV est limité durant les 4 premières semaines (DO210< 10) et prend une allure exponentielle au delà de 10 semaines de culture. Il semble que la lyse de la souche codée ECLR2 soit plus précoce; ce qui est à relier avec sa faible capacité de croissance en milieu liquide.

Au cours du développement des moisissures, il existe un équilibre entre les enzymes lytiques et les enzymes de construction:

- en phase de croissance: la masse cellulaire augmente et les enzymes lytiques ont un rôle mineur;

- en phase de déclin: la masse cellulaire est constante et la lyse des tissus devient prépondérante. Les champignons utilisent alors les macromolécules pariétales comme source energétique (Dubourdieu, 1982). La lyse est déclenchée soit par la disparition du substrat carboné, soit par l'absence de substrat adéquat, soit par la toxification du milieu.

2 - Production de polysaccharides et de protéines exocellulaires au cours de la croissance et de la lyse

Les milieux et les conditions de culture sont identiques à ceux employés pour les expériences précédentes. Les cultures sont menées jusqu'à 3 mois et les analyses

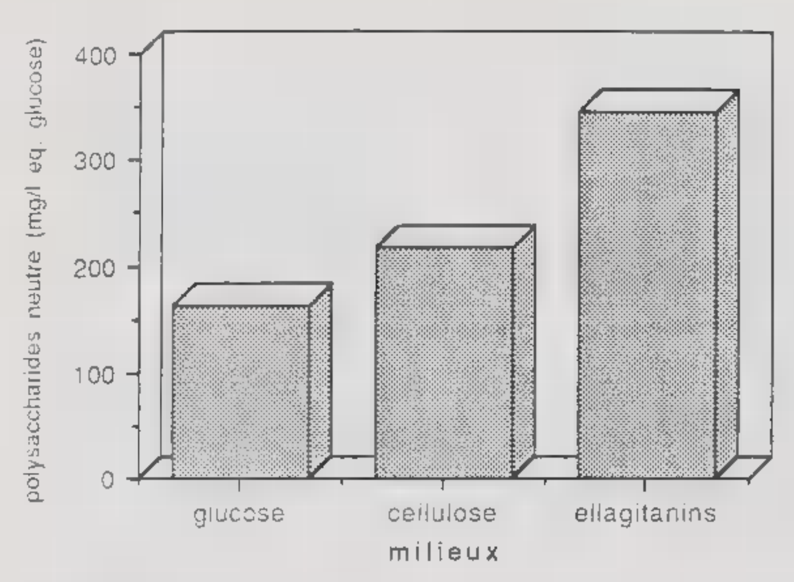


Figure 4 - Influence du substrat carboné sur la production de polysaccharides exocellulaire par *A. pullulans* après 1mois de culture. [culture: milieu liquide CZAPEK-DOX, sur table d'agitation; inoculum: 1mg/100ml; résultats ramenés pour 25g de substrat/l]

Figure 4 - Incidence of the substrat on polysaccharid's production by *Aureobasidium pullulans* after 1 month.

suivantes sont effectuées sur les surnageants obtenus après centrifugation (4500 tpm; 30mn):

- polysaccharides acides au métaphenyl-phénol (Dubourdieu, 1982);
- polysaccharides neutres au phénol sulfurique (Dubourdieu, 1982);
- les protéines totales au bleu de coomassie (Bradford, 1976).

En fin de croissance active, *A. pullulans* a libéré dans le milieu entre 150 et 350mg/l de polysaccharides neutres (fig. 4). Sur un milieu non agité on peut supposer que la production de polysaccharides est plus limitée (Llauberes, 1988).

La nature de la source d'énergie influence fortement la production de polysaccharides. On observe que plus le glucose est difficile à investir dans le métabolisme (cellulose, ellagitanins), et plus le champignon forme de polysaccharides exogènes. En outre, plus le substrat est pauvre en ose (ellagitanins), plus le relargage est intense. Ainsi la production des polysaccharides semble être reliée aux difficultés de croissance dans le milieu.

Le tableau VIII montre, d'une part, l'absence de polysaccharides acides chez les souches étudiées, d'autre part, la faible proportion de proteïnes, sauf pour *A. pullulans* (SNDS1-91), enfin, la forte production de polysaccharides neutres par *Aureobasidium sp.* (1g/l) et *R. stolonifer* (1g/l). Les propriétés polysaccharidogénes d'*A. pullulans* sont établies depuis longtemps (Bouveng & al., 1963); et sont susceptibles de permettre l'inactivation de la fraction astringente des tanins du bois.

Tableau VIII: Libération de protéines et de polysaccharides exocellulaires par différents champignons isolés du bois de chêne au cours de leur lyse [culture: 4mois en milieu liquide, sur table d'agitation; inoculum: 1mg/100ml]

Table VIII: The prodution of proteines and polysaccharides by different fugus during the autolys.

	Polysaccharides acides mg/l eq. ac. galacturonique	polysaccharides neutres mg/l eq. glucose	Proteines totales mg/l eq. BSA
Trichoderma koningii (VCFS1-91)	0	198	1,5
Trichoderma harzianum (VFFS1-91)	0	495	tr
Aureobasidium pullulans (PNDS4-91)	0	806	tr
(SNDS1-91)	0	1375	12
Rhizopus stolonifer (SB1-92)	0	1053	tr
Souche non identifiée (ECLR2-91)	0	341	0,25

tr: trace; BSA: bovine serum albumine

V - Caractérisation des activités enzymatiques

L'aptitude de certaines espèces de champignons à se développer sur des milieux particuliers (cellulose, polysaccharides, tanins de chêne) suggère l'existance de matériel enzymatique adaptatif assurant l'utilisation de la fraction osidique des différents substrats.

Les études portent essentiellement sur *A. pullulans*, car il s'agit d'une souche fréquemment rencontrée tout au long du séchage naturel.

Un test préalable sur galerie API LRA, OSIDASE™ révèle un grand nombre d'activités exocellulaires osidiques dans les 10 premières heures de culture, en milieu non proliférant ou sur extrait de bois de chêne. En revanche, le milieu supplémenté en glucose présente un profil enzymatique (OSIDASES) d'intensité trop faible pour être lue. Les principales activités d' *A. pullulans* sont évaluées grace à des substrats pNP (p-nitrophényl) selon la technique de Darriet & al. (1988) et s'exprime en DO 400nm/ml/12H d'incubation à 25°C. L'activité α- amylase se mesure avec le kit AMYLASE 3™ (SIGMA) sur 20µl de prise d'essai (protocole adapté de la mesure de l'activité α amylase dans les urines) et s'exprime en 10^3 unité/ml/mn.

1- mise [redacted] évidence de quelques activités osidiques chez *Aureobasidium pullulans:*

A. pullulans possède essentiellement une activité β-glucosidase (fig. 5), qui peut être inhibée par le glucose (Darriet & al., 1988). *Trichoderma sp.* présente un profil enzymatique comparables. Le culot de centrifugation en condition non proliférante ou le surnageant de culture possède également de fortes activités β-glucosisase. Cette activitée est thermodégradable (1h à 65°C), fortement réprimée par les tanins condensés du raisin (100mg/l). A contrario, les ellagitanins n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique même à des concentrations plus élevées (1g/l). Enfin l'activité ne semble pas être inhibée par des teneurs en NaCl de l'ordre de 0,5 à 1 $M.l^{-1}$.

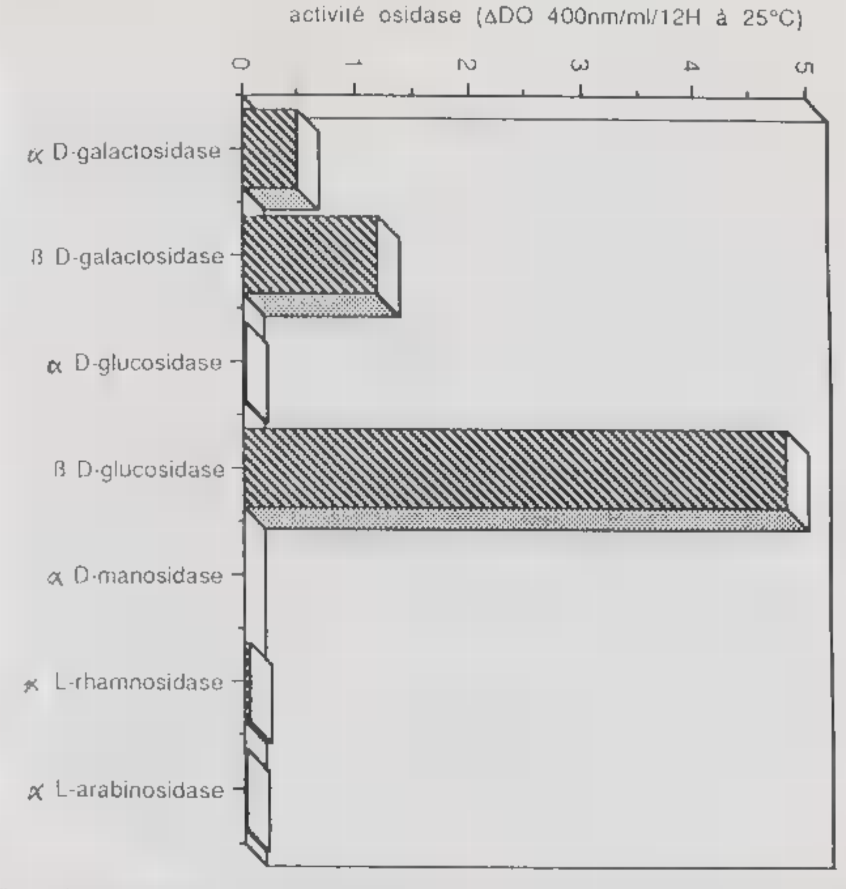


Figure 5 - Estimation des activités galactosidases, glucosidases, manosidase, rhamnosidase et arabinosidase de *A. pullulans*. [activités mesurées sur les p-NP-osides corespondants]

Figure 5 - Differents osidases activities of *Aureobasidium pullulans*

2 - profil enzymatique total. Monographie des activités estérases et osidases

Les tests sont pratiqués sur galeries API. ZYM. LRA™, en suivant le protocole établi par le fabricant. Les résultats sont regroupés dans le tableau IX.

Les profils enzymatiques moyens (n = 5) présentés permettront une identification plus aisée de ces deux champignons. Il est intéressant de remarquer que *A. pullulans* possède un spectre d'activité osidique et estérasique plus large que celui de *T. harzianum*. On peut souligner l'activité maltose et lactose (fait peu fréquent) et l'activité butyrate et valérate estérase d'*A. pullulans*.

CONCLUSION

Le séchage du bois de chêne destiné à la tonnellerie ne constitue pas seulement une étape de déshydratation. La perte de l'eau excédentaire peut facilement être

Tableau IX: Profils osidases et estérases de *Trichoderma harzianum* et *Aureobasidium pullulans*.
-; +; ++; +++: intensité croissante de la réaction colorée.

Table IX: Osidases and esterases activities of *Trichoderma harzianum* and *Aureobasidium pullulans*.

Activités osidases

Activités	*Trichoderma harzianum*	*Aureobasidium pullulans*
a-D-galactosidase	+ + +	+ + +
b-D-galactosidase	+ + +	+ + +
a-L-rhamnosidase	+ + +	+ + +
a-L-arabinosidase	+ + +	+ + +
a-D-glucosidase	+ +	+ +
b-D-glucosidase	+ + +	+ + +
b-D-galacturonase	-	+
b-D-glucuronosidase	-	+
a-D-matosidase	-	+
b-D-maltosidase	+	+
N-acetyl-a-D-glucosaminidase	+ + +	+ + +
N-acetyl-b-D-glucosaminidase	+ + +	- - -
a-L-fucosidase	+ - -	+ + +
b-D-fucosidase	+ + +	- - +
b-L-fucosidase	+ + +	+ + +
b-D-lactosidase	+ +	- -
a-D-manosidase	+	+
b-D-manosidase	-	-
a-D-xylosidase	-	-
b-D-xylosidase	-	-

Activités estérases

Activités	*Trichoderma harzianum*	*Aureobasidium pullulans*
C4-estérase	-	+ + +
C5-estérase	-	+ +
C6-estérase	-	+
C8-estérase	+ +	+ + +
C9-estérase	-	+ + +
C10-estérase	+	+ +
C12-estérase	+ + +	- + +
C14-estérase	-	[illegible]
C16-estérase	+ +	- +
C18-estérase	+	+

obtenue en étuve. Mais la qualité du bois n'est pas comparable à celle induite par un séchage lent en conditions naturelles.

L'observation attentive de la surface du bois révèle l'existence d'une flore fongique caractérisée par un faible nombre de genres et d'espèces. *Aureobasidium pullulans* représente tout au long du séchage 80% des populations implantées sur le bois; *Trichoderma harzianum* et *koningii* sont les principales espèces secondaires. Il est possible de rencontrer d'autres genres beaucoup plus rares, qui ne constituent pas, pour les parcs à bois Bordelais, une flore caractéristique.

Les moisissures se développent à la surface des merrains à la faveur d'une pluie, et grâce à l'hygrométrie relative souvent élevée en climat océanique. Au cours de la colonisation, les mycéliums libèrent dans le milieu des enzymes, essentiellement des hétérosidases et des macromolécules cellulaires (polysaccharides et protéines). L'ensemble de ces substances exocellulaire modifie profondément le profil phénolique du bois. On note en particulier une diminution très significative des impressions d'amertume et d'astringence.

Une question reste cependant en suspens. Il s'agit de savoir si les activités enzymatiques extracellulaires ont pour déterminisme la détoxification du milieu ou la recherche d'une source d'énergie. A la suite de nos travaux, il semblerait que les deux phénomènes puissent être à l'origine de l'activité phénol-hétérosidase.

Parmi les thèmes de recherche qu'il convient de suivre, on peut signaler particulièrement:

- L'étude de la microflore du chêne dans différentes régions d'approvisionnement, ainsi que l'isolement des moisissures des parcs à bois situés dans plusieurs régions Françaises et Etrangères. Ceci permettra de vérifier si nos résultats sont le reflet d'une flore fongique spécifique du bois de chêne ou au contraire si chaque terroir induit une diversité de genre et d'espèce de champignons.

- L'impact de la microflore sur les composés aromatiques du bois de chêne, en particulier les isomères de la β-methyl-γ-octalactone et de l'eugénol.

- Le rôle des mécanismes oxydatifs associés aux actions fongiques, sur l'insolubilisation de certains ellagitanins.

- L'nfluence du séchage naturel sur l'ultrastructure et la porosité du bois de chêne. Ce dernier sujet est en cours d'étude dans nos laboratoires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARTIGUES M., 1981 - Recherches de critères de selection de clones de Trichoderma actifs contre le *Sclerotinia minor* et *Sclerotium rolfsii*. Thèse docteur-ingénieur, Montpellier.

BOTTON B., BRETON M., LEVRE M., GUY Ph., LARPENT P. et VEAU P., 1985 - *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielles.* Masson ed. Paris.

BOUVENG H.O., KIESSLING H., LINDBERG B., and Mc KAY J., 1963 - Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans (Aurebasiduim pullulans). Acta Chem. Scand.* 17: 1351-1358.

BRADFORD H., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microorganismes quantities of proteïns utilising the princip of proteins-dye-binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.

CHEN C.H., JAMIESON A.M. and VAN GHELUW L., 1980 - The release of fatty acids [redacted] a consequence of yeast autolysis. *Amer. Soc. Brewing. Chemist. J.* 38, 1: 13-18

CHEN C.L. and CHANG H.M., 1985 - Chemistry of lignin biodegradation. in *"Biosynthesis and Biodegradation of wood conponents"* ed. Higuchi.

DARRIET Ph., BOIDRON J.N. et DUBOURDIEU D., 1988 - L'hydrolyse des hétérosides terpeniques du Muscat à petits grains par les enzymes periplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae. Connaissance Vigne Vin.* 22, 3: 189-195.

DUBOURDIEU D., 1982 - Recherches sur les polysaccharides sécrétés par *Botritis cinerea* dans la baie de raisin. Thése d'état es science. Université de Bordeaux II.

FEUILLAT M., 1985- Aluine caratteristiche del metodo classico di elaborazione degli spumante. *Enotecnico* 21, 5, 475-484.

GARBAY S. et LONVAUD-FUNEL A., 1991 - Etude de la lyse de Leuconostoc onos. *J. Int. Sc. Vigne Vin.* 24, 4, 157-167.

GIORDANO G., 1987 - Caractteristiche fisiche et meccaniche del legno. in *"Technologia del legno".* vol. 1. Utet ed.

GLORIES Y., 1978 - Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse doct. és sciences. Université Bordeaux II.

GREAVES H., 1970 - The effect of some wood inhabiting bacteria on the permeability of *Eucalyptus regnans* and *Pinus radiata* sapwood and heartwood. *Holzforschung.* 24 6-14.

HIGUCHI T. FUKAZAWA K. and SHIMADA M., 1967 - *Res. Bull. Collège Exp. For.* 25, 167-

JARVIS B., 1978 - Methods for detection fungi in foods and beverages. In *"food and beverage mycologie".* ed. Beuchat, Wesport Conn. Avi. Pub. Inc.

JOSEPH E., MARCHE M., GOIZET A. et AUDEBERT J., 1975 - Etude théorique sur le cognac et son vieillissement en fûts de chêne. *Rev. Fr. Onol.* 57: 1-17.

LLAUBERES R.M., 1988 - Les polysaccharides sécrétés dans les vins par *Saccharomyces cerevisiae* et *Pediococcus* sp. Thèse docteur de l'Université de Bordeaux II.

MARCHE M et JOSEPH E., 1972 - Etude théorique sur le cognac, sa composition chimique et son vieillissement en fûts de chêne. *Rev. Fr. Onol.* 57: 1-106.

MONTIES B., 1992 - Composition chimique du bois de chêne: composés phénoliques, relation avec quelque propriétés physiques et chimiques succeptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. In *"le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie"* ed. vigne et vin publ. internat.

PENG S., SCALBERT A. and MONTIES B., 1991 - Insoluble ellagitanins in *Castanea sativa* and *Quercus petreae* woods. *Phytochem.* 30, 3: 775-778.

PONTALLIER P., 1981 - Recherche sur les conditions d'élevage des vins rouges. Rôle des phénomènes oxydatifs. Thèse Doct-Ing, Université Bordeaux II.

PONTALLIER P., SALAGOITY M.H. et RIBERAU-GAYON P., 1982 - Intervention du bois de chêne dans l'évolution des vins rouges élevés en barriques. *Connaissance vigne vin* 16. 1: 45-61.

SILVA A., FUMI.M D., MONTESISSA G., COLOMBI.M G. et COLANGRANDE O., 1987 - Incidence de la conservation en présence de levures sur la composition des vins mousseux. *Connaissance vigne vin* 21, 3: 141-162.

TARANSAUD J., 1976 - *Le livre de la tonnellerie.* ed. La roue à livres diffusion.

VIVAS N. et GLORIES Y., 1992 - Rôle et importance du mode de séchage du bois destiné à la fabrication des barriques: Incidence sur la porosité et sur la saveur des composés phénoliques. (en préparation)

WOOD R., 1951 - The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms. I- The control of *Botritis cinerea. Ann. Appl. Biol.* 38, 203.